

**DNA ANALYSIS**

D2'

Patent Number: JP10262699  
Publication date: 1998-10-06  
Inventor(s): UEMATSU KAZUMUNE;; KANBARA HIDEKI  
Applicant(s): HITACHI LTD  
Requested Patent: JP10262699  
Application Number: JP19970074983 19970327  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12Q1/68  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To analyze a DNA by determining the sequences of restriction enzyme-treated fragments of the sample DNA, reconstructing the each fragment by arranging according to the whole permutation, cutting the sample DNA by another restriction enzyme, and comparing the lengths of the cut fragments of the sample DNA with that of the fragments of the reconstructed DNA.

**SOLUTION:** A DNA is analyzed by determining the sequences obtained by forming the sample DNA 1 into fragments 2 by a restriction enzyme and amplifying the respective fragments 2, reconstructing the respective fragments 4 having determined sequence by arranging the fragments according to the whole permutation to produce virtual structural base sequence group 5, cutting the sample DNA by another restriction enzyme and measuring the lengths of the fragments, and comparing the lengths of the cut fragments of the sample DNA with the length of the fragments to be formed by cutting the reconstructed candidate base sequence group to determine the reconstructed base sequence bound in the correct order from the candidate reconstructed base sequence group in the method for analyzing the DNA. The DNA is readily analyzed by the method without time and effort for searching duplex parts for binding respective fragments and useless operation such as plural determinations of the sequence of the same part.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-262699

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>C 1 2 Q 1/68  
// C 1 2 N 15/09

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68  
C 1 2 N 15/00Z  
A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平9-74983

(22) 出願日

平成9年(1997)3月27日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 植松 千宗

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

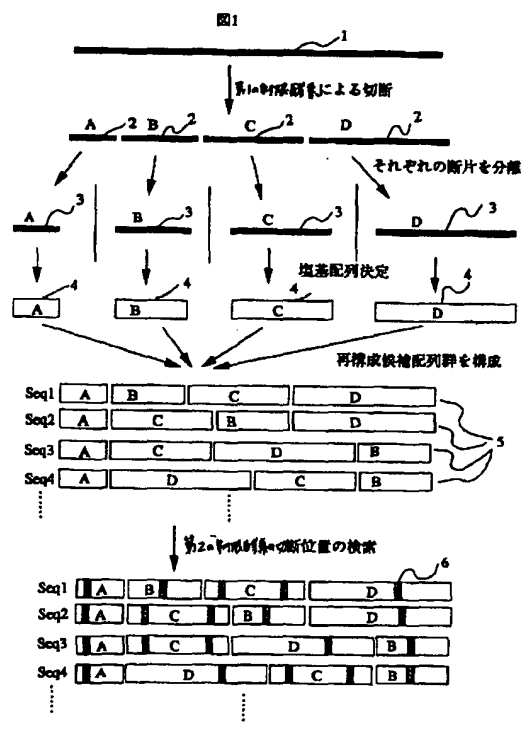
(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

(54) 【発明の名称】 DNA解析法

(57) 【要約】

【課題】 DNA塩基配列決定で塩基配列の重複読みをなるべく少なくして制限酵素切断断片同士の相対的な位置関係を決定して、各断片の繋ぎ合わせを行う。

【解決手段】 ある制限酵素Aで切断したDNA断片の各断片の塩基配列を決定する。これらの断片群をすべての順列で並び変えた再構成候補配列群を作成する。これらの再構成候補配列群を別の制限酵素Bの切断部位を検索し、各再構成候補配列が制限酵素Bで切断された場合どのような長さの断片が生じるかを調べる。実際にDNAを制限酵素Bで切断した断片の長さをゲル電気泳動により決定して、再構成候補配列群のなかから正しく再構成された配列を決定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料 DNA を制限酵素を用いて断片化し各断片を増幅した後に配列決定を行うプロセスと、配列決定された各断片を全ての順列で並べて繋ぎ合わせた仮想再構成塩基配列群を作製するプロセスと、試料 DNA を別の制限酵素で切断してその断片長を測定するプロセスと、再構成候補塩基配列群をその制限酵素で切断した場合に生じる断片長と試料 DNA を切断して得られた断片長を比較して再構成候補塩基配列群のなかから正しい順番で繋ぎ合わされた再構成塩基配列を決定するプロセスからなることを特徴とする DNA 解析法。

【請求項 2】 試料 DNA から制限酵素を用いて断片を生成し各断片の塩基配列決定によって得られる塩基配列情報と、別の複数の制限酵素によって得られる DNA 断片長の情報を比較することによって制限酵素切断断片同士の位置関係を決定することを特徴とする DNA 解析法。

【請求項 3】 請求項 1 において、配列決定を行った断片同士を考えられ得るすべての順列に繋ぎ合わせた再構成候補配列群を作成し、それらの配列情報を用いて各断片同士の位置関係を決定する DNA 解析法。

【請求項 4】 請求項 1 において、配列決定を行った断片同士を考えられ得るすべての順列に繋ぎ合わせた再構成候補配列群を作成する DNA 解析プロセス。

【請求項 5】 断片化した DNA を繋ぎ合わせる際に塩基配列の重複読みを行わずに断片同士の位置関係を決定することを特徴とする DNA 解析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】 本発明は DNA 解析法に関する。

## 【 0 0 0 2 】

【従来の技術】 コスミドベクタに挿入された 5 0 k b 程度の DNA の全塩基配列を決定する場合など、DNA シーケンサで一度に決定できる 5 0 0 塩基以上の長い DNA の塩基配列を決定するには配列決定の前に DNA を扱いやすい大きさにする段階を経る必要がある。DNA を扱いやすい大きさにするには、従来二つの方法がある。第 1 の方法は制限酵素を用いてある特定の部位で DNA を切断する方法である。第 2 の方法は超音波を用いてランダムに DNA を切断して DNA を扱いやすい大きさにする方法である。

【 0 0 0 3 】 第 1 の方法で扱いやすい大きさにされた DNA の塩基配列決定は切断 DNA 断片の位置関係を示す制限酵素地図を作成してから行われる。つまり DNA を複数の制限酵素で切断して、それらの断片群の相対的な位置関係を示す制限酵素地図を作成してから各断片の塩基配列を決定し、制限酵素地図で明らかにされた位置関係をもとに各断片から得られた塩基配列をつなぎ合わせて全塩基配列を決定するのである。

【 0 0 0 4 】 第 2 の方法はショットガン法といわれる方

法である。この方法では DNA を扱いやすい大きさにする際にランダムに DNA を切断するため切断 DNA 断片が互いに重複部分を持っていることを利用して、各断片の塩基配列を決定してから得られた塩基配列情報をもとにお互いの重複部分を重ね合わせて全塩基配列を再構成するものである。

## 【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】 制限酵素地図を作成するには DNA を複数の制限酵素で切断して、それらの断片を適当なベクタに組み込んでサブクローニングを行う。この後、ある断片の塩基配列を末端から別の断片と重なり合う部分まで決定して、断片同士の重なり合いの情報を示す制限酵素地図を作成する。ある断片の末端から配列を決定して行くとき別の断片と重なり合う部分がどこに存在しているのかは予測できないため、重複部分が見つかるまで末端から配列決定する必要がある。たいていの場合、末端からの一度の塩基配列決定では重複部分まで到達しないのでこの操作はかなり時間のかかる作業となる。各断片の相対的な位置関係を示す制限酵素地図が得られれば、配列決定すべき断片を効率良く選び出すことができ、配列決定での重複読みといった無駄を少なくすることができる。しかし制限酵素地図の作成は非常に手間と時間のかかる作業になるという難点がある。

【 0 0 0 6 】 一方、ショットガン法では超音波によって短く断片化した DNA をサブクローニングして、この結果得られたサブクローンをランダムにピックアップして塩基配列決定を行う。その後、各サブクローンからの配列情報を重ね合わせて全体の塩基配列を再構成していくのであるが、サブクローンをランダムにピックアップするために同一種類のサブクローンをピックアップしたり、ほとんどオーバーラップしているサブクローンをピックアップすることもあり、全体の配列を覆い尽くして元の DNA 配列を再構成するためにはその 5 倍から 1 0 倍の長さの配列を読む必要がある。この方法では断片の位置関係の情報を必要とせずに塩基配列決定作業に入ることができるが、せっかく配列決定した部分がすでに配列のわかっている部分であることがあり、無駄の多いのが難点である。

【 0 0 0 7 】 本発明はこれらの難点を解決し、各断片を繋ぎ合わせるために重複部分を探す手間や同じ部分を複数回配列決定するという無駄をなくして簡便に DNA の解析を可能にするものである。

## 【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】 上記目標を達成するために、本発明ではまず塩基配列決定を行う DNA を制限酵素で切断する。制限酵素で切断した DNA をベクタに導入して各断片をクローニングして増幅したのち、電気泳動によってベクタに導入した DNA 断片の大きさを測定する。さらに各断片を含むクローンを電気泳動法により精製する。精製した各クローンを再びクローニングして

十分増幅した後に各断片の塩基配列を決定する。精製したクローンを再増幅してから塩基配列を決定するため、同じ部分を複数回配列決定することなく、無駄なく配列決定を行うことができる。全ての断片の配列を決定した後、決定した塩基配列長が電気泳動によって測定したDNA断片長と一致することを確認する。

【0009】次に各断片を考えられるすべての順列によって並び替えた、再構成候補配列群を作成する。再構成候補配列群のうちの一つが実際に各断片を正しい順序で繋ぎ合わせた真の再構成配列である。再構成候補断片群について数種類の制限酵素の認識配列の位置を検索し、ある再構成候補配列を制限酵素によって切断した場合にどのような長さのDNA断片を生じるかを計算して求める。

【0010】次に切断部位を検索した制限酵素で実際に配列決定を行うDNAを切断し、その結果生じた断片の長さをゲル電気泳動で測定する。実際にゲル電気泳動で決定したDNA断片の長さ、再構成候補配列群から生じる断片の長さを比較して、どの再構成候補配列が元のDNA配列から生じる断片の長さとも一致するような断片を与えるかを調べ、この再構成配列が真の再構成配列つまり元のDNA配列であることを求める。これによって制限酵素によって切断された断片の繋ぎ合わせの順序を決定することができ、再構成候補配列群の中から実際のDNA配列を求めることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

(第1の実施例) 試料として入ファージDNAを用いた。図1に示すように入ファージDNA 1を第1の制限酵素で切断する。切断された各DNA断片2をクローニングベクタに導入してクローニングを行う。各DNA断片をクローニングにより増幅した後、電気泳動により精製を行う。精製されたDNA断片3を再びクローニングで増幅して、塩基配列決定に必要な量を得る。各DNA断片3について塩基配列決定を行う。

【0012】第1の制限酵素で切断した結果生じる各DNA断片の塩基配列決定後、配列決定されたDNA断片4をあらゆる順序で繋ぎ合わせた再構成候補配列群5を作成する。再構成候補配列群5はDNA断片をあらゆる順序で繋ぎ合わせた配列であるので、DNA断片の数が2本の場合には2候補配列、3本の場合には6候補配列、n本の場合にはn! 候補配列からなる。

【0013】次に図2に示すように先に用いた第1の制限酵素とは異なる認識配列を持つ第2の制限酵素を用いて入ファージDNA 1を切断する。第2の制限酵素によって生じた入ファージDNA切断断片8のゲル電気泳動を行う。その泳動パターン12と分子量マーカ11の移動度から第2の制限酵素によって生じたDNA断片長を測定する。さらに異なる認識配列を持つ制限酵素についても同様に入ファージDNAを切断し、ゲル電気泳動に

よりその長さを測定しておく。

【0014】図1および図3に示すように再構成候補配列群について第2の制限酵素あるいはそのほかに用いた制限酵素の認識配列の存在場所を検索プログラムを用いてコンピュータ上で検索する。検索の結果それぞれの制限酵素による切断位置6がわかる。再構成候補配列群の配列それぞれについて、第2の制限酵素あるいはその他に用いた制限酵素の切断位置からそれぞれの制限酵素によって生じる各DNA断片の長さの情報20を計算によって得る。

【0015】最後に計算によって得られた再構成候補配列群の各配列の切断断片の長さの情報20と実際のDNAを制限酵素Bで切断し、ゲル電気泳動の泳動パターン12から得た各DNA断片の長さを比較する。再構成候補配列群のうち、正しい順序で各断片を繋ぎ合わせた配列21だけが実際にDNAを第2の制限酵素で切断した結果生じる断片長と一致する切断断片長を与えるので、再構成候補配列群の中から正しい順番に並び変えて得られた再構成配列22を決定することができる。

【0016】(第2の実施例) 第2の実施例に試料としてプラスミドに挿入されたヒトの遺伝子8.9k 塩基長を用いた。

【0017】(試料DNAの断片化と断片末端への既知配列の導入) 図4に示すように制限酵素を用いて試料DNA 30を切断してDNA断片31を得る。得られたDNA断片31の両末端に既知配列を持つオリゴマを導入する。オリゴマの導入方法はDNAリガーゼを用いて予め合成された2本鎖オリゴマをDNA断片末端に結合させて導入する方法とターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて、dATPあるいはdUTPなどある特定の塩基をDNA断片末端に付加する方法があり、どちらを用いてもよいが本実施例では前者を用いた。

【0018】DNA末端とオリゴマの間でホスホジエステル結合を形成させるため、DNA断片3' 末端に接するオリゴマ40の5' 末端をリン酸化しておく。DNA断片同士の結合を防ぐためにアルカリフォスファターゼを用いてDNA断片5' 末端のリン酸基を除去し、オリゴマ同士の結合を防ぐためにDNA断片5' 末端に位置するオリゴマ41の3' 末端をリン酸化しておく。DNA断片に結合させるオリゴマ40とそれに相補的な配列を持つオリゴマ41をハイブリダイズさせて2本鎖のアダプタ42を形成させ、DNAリガーゼを用いてDNA断片31と結合させる。3' 末端がリン酸化されたオリゴマ41とDNA断片31の5' 末端の間にはホスホジエステル結合は形成されず、DNA断片31の3' 末端と5' 末端がリン酸化されたオリゴマ40の間にホスホジエステル結合が形成される。その結果DNA断片31の+鎖、-鎖両方の3' 末端にオリゴマを導入したDNA断片32ができる。

【0019】(DNA断片の断片長の計測)調整されたDNA断片の断片長を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくはアガロース電気泳動で計測する。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動では1000塩基長程度のDNA断片長をほぼ1塩基長の分解能で計測でき、アガロース電気泳動では3000塩基長程度のDNA断片長をほぼ10塩基長の分解能で計測できるので、DNA断片の長さが1000塩基より短い場合には前者を用い、1000塩基より長い場合には後者を用いて断片長の計測を行う。DNA断片長が3000塩基を超える場合には計測の精度は落ちるが、試料DNAを複数の制限酵素を用いて断片化すれば3000塩基を超えるDNA断片も計測精度の良い断片長に断片化することができる。

【0020】アガロース電気泳動による断片長の計測は図2に示すように断片化したDNA 8を電気泳動で分離した後、エチジウムブロマイドなど2本鎖DNAに結合するインターカレータと呼ばれる試薬で染色標識して検出分子量マーカ11の位置から断片長の計測を行う。

【0021】変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による断片長の計測ではDNA断片は1本鎖の状態で泳動されるため、インターカレータによる標識はできない。そこで予め蛍光標識したプライマ48を利用して断片長の測定を行う。蛍光標識したプライマ48は以下の特徴を持つものを用意する。

【0022】断片長の計測に利用するプライマ48は塩基配列決定反応にも使用できるプライマを用いる。すなわち、制限酵素切断部位付近の配列を読めるようにアンカプライマと成り得る配列50の部分、DNA断片に導入したオリゴマの少なくとも一部と相補的な配列51の部分、試料DNAを断片化するのに用いた制限酵素の認識部位に相補的な配列52の部分、およびA、C、G、T4塩基の任意の配列2塩基からなる配列53の部分から構成させている。任意配列の部分は2塩基の全ての可能な組み合わせである16種類からなるので、用意するプライマは計16種類となる。プライマの3'末端の塩基がハイブリダイズしていないとDNA鎖の伸長反応は起らない。このため3'末端に任意配列を有するプライマでは複数種のDNA断片のなかから選択的に伸長反応が起きるDNA断片60を選択することが可能である。このような性質から3'末端にこのような任意配列を有するプライマを選択プライマと呼ぶ。

【0023】用意した選択プライマのうち1種類を用いて相補鎖合成反応を行う。この反応は鋳型DNAの端まで伸長反応が進行するとそれ以上は鋳型DNAがないので伸長できない。従って過剰量の蛍光標識プライマと耐熱性DNAポリメラーゼを用いて、DNA鎖の変性→DNAとプライマとの結合→プライマの伸長反応という熱サイクルにかけて伸長反応を複数回行うとDNA断片と同じ断片長の蛍光標識された1本鎖DNAが反応産物として得られる。全てのDNA断片に対して1本鎖DNA

を同時に調製するとDNA断片の種類が多い場合には分離が困難になる。しかし選択プライマを用いて反応を行うと鋳型DNAのうち、プライマの3'末端にある任意配列と鋳型DNAがハイブリダイズしたDNA断片に対してだけ断片長の等しい蛍光標識された1本鎖DNA断片が合成されるので断片の分離が容易になる。

【0024】用意したプライマ16種類に対して同様に伸長反応を行うと全ての鋳型DNAに対する1本鎖DNA断片を合成させることができる。16種類のプライマに対する各反応産物をそれぞれ別のレーンで変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動して断片長の計測を行う。

【0025】以上のような手順でDNA断片の断片長の計測を行う。同様の手順を繰り返して試料DNAを異なる制限酵素によって断片化した場合についてもDNA断片の断片長の計測を行い、試料DNAを種々の制限酵素で切断した場合に生じるDNA断片長を計測しておく。

【0026】(DNA塩基配列の決定)DNA塩基配列決定は制限酵素で断片化したDNA断片の配列を順次決定する。上述の方法で末端に既知配列を導入したDNA断片の配列の決定は蛍光標識した選択プライマを用いれば良い(DNA Research Vol. 1, 231-237, 1994)。またDNA断片末端の配列を決定するためにアンカ配列部分をプライマに用いてもよい。この場合には断片長の計測から得られたDNA断片末端2塩基の情報を用いてPCR増幅を行い配列決定するDNA断片を増幅する。

【0027】DNA制限酵素断片の+鎖、-鎖の断片長は等しいので断片長計測時に伸長反応が進行した断片のうち同じ断片長を持つものがそれぞれDNA断片の+鎖と-鎖である。従って伸長反応が進行した選択プライマを組み合わせるとPCR増幅を行えば、種々のDNA断片が混合物しているなかからある特定のDNA断片だけを増幅することができる。DNA塩基配列決定時にプライマを標識して配列決定反応を行う場合には未反応プライマの影響でプライマ近接部位の配列決定は困難なことがあるが、増幅反応に用いた選択プライマのアンカ配列部分をプライマとして塩基配列決定反応を行えば、配列決定用のアンカプライマに近接する部位は増幅に用いた選択プライマの部分になり、DNA断片末端部分は配列決定用アンカプライマの末端と近接しなくなるので配列決定時のエラーを低減することができる。

【0028】配列決定反応にターミネータ標識法を用いても同様にDNA断片末端部分の読み間違いを少なくすることができる。

【0029】以上のように試料DNAを制限酵素処理して得られた各DNA断片の塩基配列を決定する。あとは第1の実施例と同様に得られた各DNA断片を全ての順列で繋ぎ合わせた再構成候補配列群を作製し、再構成候補配列中に存在する制限酵素認識部位を検索する。試料DNAを切断してその結果生じたDNA断片長を計測す

るのに用いた制限酵素の認識配列を検索し、再構成候補配列の切断パターンを求める。再構成候補配列群のうちの一つが正しい再構成配列であるので、各再構成候補配列の切断パターンと実際の試料DNAの切断パターンを比較して正しい再構成配列を求め、試料DNAの塩基配列を決定する。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば塩基配列決定の際に行う断片の繋ぎ合わせを塩基配列情報と別の制限酵素で切断した断片の長さの情報から行うことができる。これにより従来非常に手間と時間を必要とした制限酵素地図の作成を行うことなくDNAの解析が可能となる。またショットガン法に見られるような同じ部分の重複読みを行う必要がないため、決定する塩基配列数の何倍もの塩基数を読むことなく、効率良く塩基配列決定を行うことがで

きる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1の実施例における再構成候補配列群作成の説明図。

【図2】本発明の第1の実施例におけるDNA切断断片の断片長測定の説明図。

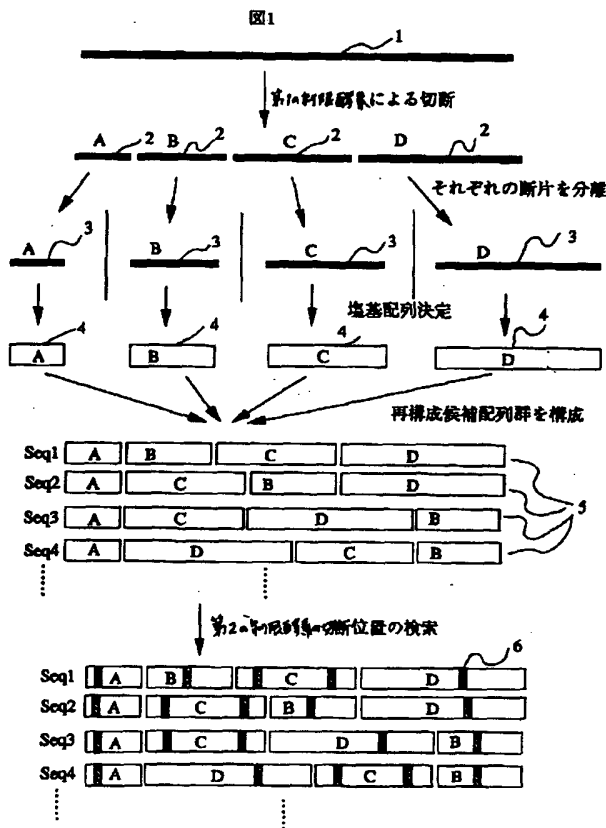
【図3】本発明の第1の実施例における再構成配列決定の説明図。

【図4】本発明の第2の実施例のDNA塩基配列決定方法の説明図。

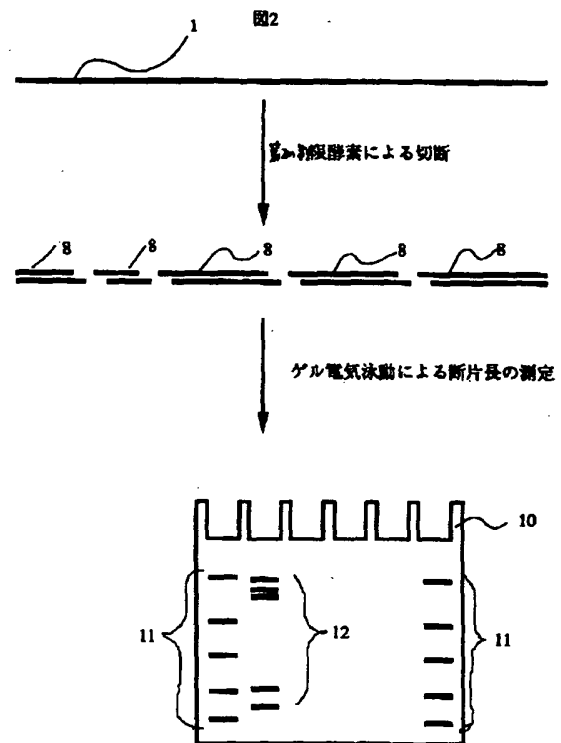
【符号の説明】

1…λファージDNA、2…λファージDNA切断断片、3…λファージDNA切断断片、4…DNA断片の配列、5…再構成候補配列群、6…切断部位、8…λファージDNA切断断片。

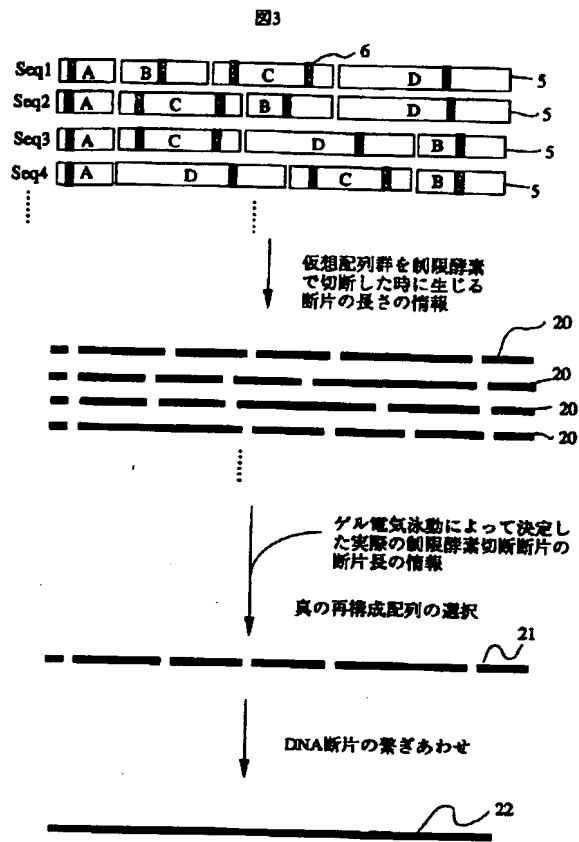
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

